

RICHARD VIEIRA CAMPOS

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
MICROESFERAS DE LEVOBUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE
50 % (S75-R25)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para aprovação ao Programa de Pós – Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tenório

Co-orientadores: Prof. Dr. Pedro Paulo Tanaka e Prof. Dr. Eduardo Murilo Novak

Coordenador do Programa:

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2007

RICHARD VIEIRA CAMPOS

**PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
MICROESFERAS DE LEVOBUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE
50 % (S75-R25)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para aprovação ao Programa de Pós – Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Tenório

Co-orientadores: Prof. Dr. Pedro Paulo Tanaka e Prof. Dr. Eduardo Murilo Novak

Coordenador do Programa:

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA

2007



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

Ata do julgamento da 314ª Dissertação de Mestrado do 437º do Programa para conclusão da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, nível Mestrado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **RICHARD VIEIRA CAMPOS**, com o título **PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO * IN VITRO * DE MICROESFERAS LEVOBUPIVACAÍNA EM EXCESSO ENANTIOMÉRICO DE 50% (S75 – R25)** na Linha de Pesquisa: Dor e Recuperação Pós-Operatória, na Área de Concentração: Clínica Cirúrgica, tendo como orientador Prof. Dr. Sérgio Bernardo Tenório

Às sete horas e trinta minutos do dia vinte e um de dezembro de dois mil e sete, no Auditório da CAD no 7º andar central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída pela Banca Examinadora pelos Professores Doutores: **Flamarion dos Santos Batista, Marcelo Abagge e Sérgio Bernardo Tenório** sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão foi apresentada pelo **Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O Candidato foi considerado **aprovado** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


Flamarion dos Santos Batista


Marcelo Abagge


Sérgio Bernardo Tenório



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Aluno RICHARD VIEIRA CAMPOS

Título da Dissertação PREPARAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO, E AVALIAÇÃO *
IN VITRO * DE MICROESFERAS LEVOBUPIVACAÍNA EM EXCESSO
ENANTIOMÉRICO DE 50 % (S75 – R25).

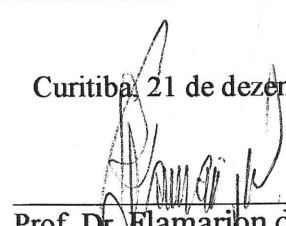
CONCEITOS EMITIDOS:

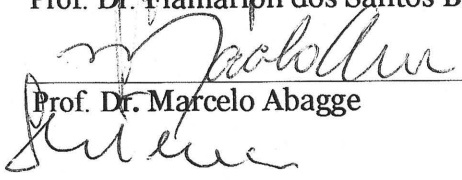
Prof. Dr. Flamarion dos Santos Batista	Conceito emitido	h	Equivalência	8.5
Prof. Dr. Marcelo Abagge	Conceito emitido	h	Equivalência	8.5
Prof. Dr. Sergio Bernardo Tenório	Conceito emitido	h	Equivalência	8.5

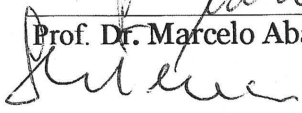
Conceito Final de Avaliação:

Conceito: h **Equivalência** 8.5

Curitiba 21 de dezembro de 2007


Prof. Dr. Flamarion dos Santos Batista


Prof. Dr. Marcelo Abagge


Prof. Dr. Sergio Bernardo Tenório

***Aos meus pais, pelo exemplo
inabalável de dedicação a família***

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias e ao Programa de Pós-graduação – Clínica Cirúrgica do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade a mim confiada.

À CAPES, pelo apoio e estímulo no desenvolvimento da pesquisa.

Ao IPEM – Faculdade Evangélica do Paraná, pelo apoio aos alunos da Universidade Federal do Paraná.

Ao Prof. Dr. Pedro Paulo Tanaka, pelo acompanhamento e revisão do estudo, e pelas críticas que propiciaram um maior aprofundamento nas questões polêmicas da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Jean-Pierre Estebe pela colaboração neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Eduardo Murilo Novak, pela sua competência, caráter, dignidade e amizade.

A funcionária do programa de Pós-Graduação Regina Aparecida Sass Marques pela sempre vontade de ajudar.

Aos meus colegas do Hospital Nossa Senhora das Graças.

Aos meus eternos mestres, pela incrível capacidade de sempre conseguir ensinar coisas novas.

Às demais pessoas que tiveram participação na minha formação, nos meus alicerces e neste estudo, as sinceras escusas por não nominá-las.

SUMÁRIO

LISTAS DE TABELAS.....	vi
LISTAS DE FIGURAS.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 LIPOSSOMAS.....	4
2.2 CICLODEXTRINAS.....	5
2.3 MICROESFERAS.....	6
2.4. LEVOBUPICACAÍNA.....	6
2.4.1. Química da Levobupicacaína.....	7
2.4.2. União a Proteínas.....	8
2.4.3. Farmacocinética.....	8
2.4.4. Farmacodinâmica.....	9
2.4.5. Toxicidade.....	9
2.4.6. Aplicações Clínicas.....	10
2.4.7. Efeitos Adversos.....	11
3. MATERIAL E MÉTODO.....	12
3.1. TAMANHO.....	13
3.2. CONTEÚDO DO MEDICAMENTO.....	14
3.3. ESTUDO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	15
4. RESULTADOS.....	17
5. DISCUSSÃO.....	19
6. CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS.....	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 DIÂMETRO MÉDIO DAS MICROPARTÍCULAS LIOFILIZADAS.....	17
TABELA 2 DADOS ANALÍTICOS... ..	17
TABELA 3 DADOS DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	18

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 MINI-BUCHI SPRAY-DRYED LABORATORIAL.....	13
FIGURA 2 MALVERN MASTERSIZE S.....	14
FIGURA 3 MODELO 500 UTILIZADO PARA ESTUDO DA LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> ...	16
FIGURA 4 ESPECTOFOTÔMETRO.....	16

RESUMO

Avaliação *in vitro* de microesferas de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R25). As microesferas podem ser utilizadas como um sistema de liberação controlada para prolongar a ação de anestésicos locais. Este estudo tem como objetivo a descrição da preparação, caracterização e análise da liberação *in vitro* de microesferas de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%. As microesferas foram preparadas utilizando o co-polímero de ácido polilático-co-glicólico contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% pelo método spray-dried. A caracterização das microesferas em relação ao seu tamanho e conteúdo foi similar aos valores teóricos. A liberação *in vitro* apresentou um padrão bifásico. O processo de fabricação de microesferas contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% pelo método spray-dried é factível de ser realizado, com resultados semelhantes aos encontrados com microesferas de bupivacaína.

Palavras-chave: anestésico local, levobupivacaína, bupivacaína, microesfera.

ABSTRACT

Microspheres could be used as drug delivery system to prolong the duration of action of local anesthetics. This study has the objective of preparation, characterization and *in vitro* release study of levobupivacaine in enantiomeric excess of 50%-loaded microspheres. Microspheres were prepared using polylactic-co-glycolic acid polymer loaded with levobupivacaine in enantiomeric excess of 50% by spray-dried process. Characterization of microspheres related to size and drug content were similar to theoretical values. Release profile showed a biphasic pattern. Spray-dried levobupivacaine in enantiomeric excess of 50% - loaded microspheres is possible, with similar profile as bupivacaine-loaded microspheres.

Key-words: Anesthetics Local; Levobupivacaine; Bupivacaine, microsphere.

1. INTRODUÇÃO

Um fármaco uma vez administrado pode provocar efeitos secundários. Portanto devemos estabelecer um adequado balanço entre os efeitos benéficos e as reações adversas que podem desencadear em diferentes órgãos(1).

A farmacologia atual encaminha seus estudos na busca de um veículo capaz de transportar o fármaco até seu lugar de ação, a fim de evitar seus efeitos adversos(2). Assim estão desenvolvendo novos sistemas de administração de fármacos, como lipossomas, nanopartículas e micropartículas, sendo carreadores coloidais que se usa como sistema de liberação de drogas(2).

Os sistemas de liberação de fármacos consistentes de polímeros biodegradáveis permitem controlar a liberação de fármacos efetivamente dentro da faixa terapêutica desejada, evitando as conseqüências de um excesso ou um déficit, que poderiam comprometer sua eficácia antes da administração da dose. Estes sistemas consistem de uma matriz polimérica que contém o princípio ativo do anestésico local(3).

Os anestésicos locais tanto por sua ação periférica quanto aplicada sobre o neuroeixo constituem importante componente no manejo multimodal da dor aguda e de algumas condições crônicas. Além de proporcionar excelente analgesia ao repouso e ao movimento, seu uso está associado a um menor consumo de opióides e a redução de seus efeitos colaterais correlacionados (3). Entretanto, na ausência de uma modalidade continua de administração, como analgesia controlada pelo paciente ou via cateter, os benefícios da ação dos anestésicos locais não ultrapassam 6 horas quando aplicados subcutaneamente e não mais que 20 horas

quando por bloqueio valendo-se de adjuvantes ou pelo aumento da concentração ou volume do anestésico local apresentando limitado benefício.

A melhora na administração regional de anestésico local pode ser obtida pela incorporação de sistema de liberação prolongada como implantes, lipossomas, complexação de drogas com ciclodextrinas ou micropartículas. Entre estes sistemas, as microesferas se tornam interessantes por sua propriedade em proporcionar uma taxa de liberação prolongada e por seu menor tamanho permitir a injeção local por meio de agulha. As microesferas de solução de levobupivacaína em excesso enantiomérico poderiam proporcionar uma liberação prolongada do fármaco permitindo uma maior duração de ação menor captação para a circulação sistêmica, evitando altas concentrações plasmáticas(4).

O objetivo do presente trabalho é a preparação, caracterização e análise da liberação *in vitro* de microesferas de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%.

2. REVISÃO DA LITERATURA

É de grande interesse compreender o fenômeno da dor e conseqüentemente conceituá-la. Isto é caracterizado por uma experiência sensitiva e emocional desagradável, em que há percepção de um estímulo nocivo associado à lesão tecidual(5).

De acordo com a lesão tecidual pode-se classificar a dor em aguda ou de curta duração e a dor crônica ou lenta. A dor crônica pronuncia-se quando termina a função dos mecanismos normais de cicatrização e estados patológicos que podem persistir por um longo período, enquanto que a dor aguda persiste apenas enquanto durar o dano representando uma reação fisiológica normal.

A dor é uma resposta do organismo a um determinado ou potencial trauma, embora em algumas situações o sofrimento doloroso perca sua função biológica e começa a representar uma conseqüência insuportável as desordens refratárias ao tratamento(6).

Muitos fármacos têm sido utilizados para o controle da dor (anticonvulsivantes, agonistas Gabaérgicos, neurolépticos), inclusive a combinação de anestésicos locais e analgésicos opióides (bupivacaína-morfina)(7). A dor também pode ser controlada pelo uso de anestésicos locais para o bloqueio de nervos periféricos específicos, embora esses fármacos apresentem limitações devido a sua duração de ação relativamente curta (2 a 4 horas)(7).

Nas últimas décadas alguns anestésicos locais como lidocaína, bupivacaína, levobupivacaína e ropivacaína têm sido introduzidos na terapia da dor aguda e crônica na tentativa de melhorar a ação dos fármacos já utilizados(6).

As características desejáveis para uma molécula anestésica são: a longa duração de ação, diminuição da toxicidade local e/ou sistêmica e aumento da seletividade para o bloqueio sensorial, em relação ao bloqueio motor(8).

Com a alteração de propriedades físicas e químicas na molécula dos anestésicos locais, alguns desses objetivos têm sido atingidos. Porém uma alternativa que atualmente vem promovendo os efeitos desejáveis e a liberação controlada desses fármacos através da encapsulação(9).

O desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem sido alvo de pesquisas recentes. Muitos resultados foram obtidos, especialmente na manipulação molecular de carreadores e no estudo de suas alterações com as drogas encapsuladas. Esses carreadores têm a vantagem de contornar propriedades físico-químicas limitantes (como a solubilidade aquosa ou em membranas) das drogas encapsuladas, melhorando assim a farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica das mesmas). Entre os principais carreadores destacam-se os lipossomas, as ciclodextrinas e as microesferas (4)

2.1 LIPOSSOMAS (10)

Os lipossomas foram descobertos em 1963, consistem de esferas microscópicas de tamanhos variados, em escalas de *nm* e *μm*. Apresentam-se com uma ou mais bicamadas lipídicas concêntricas, separadas por compartimentos aquosos, onde as caudas hidrofóbicas dos lipídeos estão voltadas para o interior e as camadas polares para o exterior da bicamada, mantendo contato com a fase aquosa.

A encapsulação de drogas é orientada pela hidro ou lipofilicidade das mesmas. As drogas hidrofílicas tendem a permanecer no compartimento central aquoso e as drogas hidrofóbicas dispersas na bicamada lipídica. A função dos lipossomas como veículos é liberar determinadas concentrações de drogas em alvos específicos evitando a toxicidade sistêmica, já que somente uma fração da droga estará disponível para o local de ação.

A similaridade dos monômeros lipídicos constituintes dos lipossomas com as membranas biológicas elimina os riscos de antigenicidade ou lesões histológicas após a administração desses veículos.

2.2 CICLODEXTRINAS(11)

A hidrólise enzimática do amido normalmente resulta na formação de glicose, maltose e em uma longa classe de dextrinas lineares e ramificadas. No entanto, alguns microorganismos e plantas (que produzem enzima ciclodextrina glicosil transferase) são capazes de degradar o amido em produtos cíclicos chamados ciclodextrinas. Sendo que as três ciclodextrinas naturais são alfa, beta e gama.

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos constituídos por unidades de glicose, capazes de complexarem em sua cavidade hidrofóbica moléculas de tamanho e polaridade apropriados, formando complexos de inclusão. A complexação altera as propriedades físico-químicas como a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das drogas (MARTHER LE et al, 2001).

2.3 MICROESFERAS (3, 4, 12, 13)

As microesferas são sintetizadas do PLA (polímero ácido polilático) ou de um co polímero de PLGA (ácido glicólico polilático), são biodegradáveis, polímeros mecanicamente estáveis, apresentando-se com comprimento entre 1 e 50 μm de diâmetro. Várias drogas podem ser incorporadas na microesferas e conseqüentemente difundidas diretamente em uma matriz polimérica. Sendo capazes de controlar ou impedir o prolongamento dos efeitos farmacológicos.

Vários métodos são descritos na literatura para preparação de micropartículas biodegradáveis de PLA e PLGA para controlar a liberação de drogas hidrossolúveis. Embora, existam condições apropriadas para encapsular drogas como as proteínas ou peptídeos, orgânicos, solventes potencialmente tóxicos são indispensáveis para dissolver estes polímeros lipofílicos(14-16).

Somente alguns métodos podem dissolver as micropartículas produzidas após sua liberação (17).

2.4 LEVOBUPIVACAÍNA (18)

A levobupivacaína é um isômero levógiro da mistura racêmica de bupivacaína.

A molécula de bupivacaína, anestésico local de ação prolongada, tem um átomo de carbono assimétrico, na origem existam duas formas moleculares simétricas, cada uma delas imagem em espelho da outra. A preparação comercial é uma mescla racêmica de estes dois isômeros, um deles gira para esquerda, denominado (S) do latim sinistro, o leve do inglês left (esquerdo); o outro gira para direita, distinguido com a letra (R da palavra inglesa right). A Levobupivacaína é o

isômero levógiro da bupivacaína. Quimicamente é um anestésico local do tipo das amino-amidas e sua produção foi feita porque se observou experimentalmente que o isômero dextro (R) tinha maior potencial de ocasionar fenômenos de neurotoxicidade, como as convulsões e os fenômenos de cardiotoxicidade, como taquicardia e outras arritmias, bloqueios atrioventriculares, alargamento do QRS e fibrilação atrial.

Estudos eletrofisiológicos em animais demonstraram que o bloqueio dos canais de sódio é estereoseletivo, sendo o isômero (R) mais potente e rápido que o isômero (S). Isto explica os maiores índices de cardiotoxicidade associados ao isômero (R) devido à maior contribuição do bloqueio na fase de platô do potencial de ação da fibra miocárdica.

2.4.1. A Química da Levobupivacaína

A Levobupivacaína é um anestésico local do tipo amino-amidas, e, como todos do seu grupo é uma base fraca e sua molécula tem três porções: um grupo amina solúvel em água em sua forma quaternária, uma cadeia intermediária onde se encontra o grupo amida (CO-NH) e um extremo lipofílico que é um anel benzênico com dois grupos metila. O Carbono situado entre o grupo amina e a cadeia intermediária é o Carbono assimétrico, que origina a diferença entre os dois isômeros Levobupivacaína e Dextrobupivacaína(19).

O fármaco se encontra em equilíbrio dinâmico na sua forma terciária, que é uma base livre e a forma quaternária com uma carga positiva tornando-se hidrossolúvel.

O pKa da Levobupivacaína é de 8,1, igual da mistura racêmica de Bupivacaína. De acordo com a acidez ou alcalinidade do meio, o pH predomina uma

das duas formas. Na medida em que aumenta o PH a nível local para a alcalinidade, e se aproxima do pKa, aumenta a porcentagem de moléculas em forma de base ou neutra, que são as que penetram através das membranas dos axônios. Ao contrário, se o pH é baixo, como acontece quando existe infecção tem uma menor porcentagem de moléculas na forma neutra, o que ocasiona uma diminuição da penetração do anestésico através da membrana do axônio(20).

2.4.2. União a Proteínas

A Bupivacaína se une as proteínas em 95%, principalmente a alfa-1-glicoproteína ácida e em menor proporção à albumina; da mesma maneira que o isômero levo tem um comportamento similar. Os pacientes desnutridos e hipoproteicos, aqueles com síndrome nefrótica e os neonatos tem para uma mesma dose uma maior quantidade de fármaco livre que os pacientes normais, pelo qual apresentam fenômenos de toxicidade com uma quantidade menor da droga. Claro que com a Levobupivacaína existe uma margem maior de segurança que com a mistura racêmica(21).

2.4.3 Farmacocinética

Leva-se em conta que a absorção da droga estará determinada por fatores como a vascularização e a presença de gordura no local.

Como a mistura racêmica, a Levobupivacaína é metabolizada no fígado, pelo sistema citocromo P450. Sua metabolização diminui proporcionalmente com a diminuição da função hepática(7).

2.4.4 Farmacodinâmica(7)

O mecanismo de ação da Levobupivacaína é exatamente igual ao da Bupivacaína racêmica e em geral igual a todos os anestésicos locais: uma vez alcançada a concentração analgésica local mínima próximo das membranas dos axônios, este fármaco produz um bloqueio dos canais de sódio na posição de repouso, de maneira que não se produz transmissão de impulsos nervosos.

Esta ação acontece com uma rapidez (latência) sensivelmente igual ao da Bupivacaína. A duração de ação é também similar ao do composto racêmico.

2.4.5 Toxicidade

Em estudo, duplamente encoberto realizado em voluntários foi administrado por via endovenosa 10mg minuto de Bupivacaína ou de Levobupivacaína até o aparecimento de sintomas iniciais de toxicidade do sistema nervoso central. Estes apareceram com uma dose menor (47.1MG) com a Bupivacaína que com a Levobupivacaína (56.1MG). A redução de índice sistólico foi menos com a Levobupivacaína (-5.14ml/ m²) que com a Bupivacaína (-11.86ml/ m²), como também o índice de aceleração (-0.09 S² vs. 0.2 S²) e a fração de ejeção (-2.5% vs. -4.29%). Deduzindo-se que o efeito inotrópico negativo foi menor com a Levobupivacaína que com a Bupivacaína medido através do índice sistólico (-9.7% vs. -21.4%), do índice de aceleração (-6.6% vs. -14.6%) e da fração de ejeção (-3.9% vs. -6.6)(22).

A Levobupivacaína não produziu um aumento significativo no intervalo PR e no intervalo QT, o aumento apenas significativo com a Bupivacaína.

A Levobupivacaína causa uma menor depressão miocárdica do que a Bupivacaína, pois ao medir a frequência máxima de despolarização V_{max}, as

concentrações plasmáticas das drogas revelaram manifestações de toxicidade do sistema nervoso central em concentrações maiores com a Levobupivacaína que com a Bupivacaína (2.62 vs.2.25 MG por l). Esta concentração de Levobupivacaína apesar de ser maior teve um menor efeito inotrópico negativo que a bupivacaína, medido com índice sistólico, índice de aceleração e fração de ejeção.

Os estudos em humanos ratificaram os experimentos com animais, como o de Huang, quem aplicou doses progressivas dos fármacos em ovelhas, até o aparecimento de convulsões. Estas apareceram com 103 mg de Levobupivacaína e 85 mg de Bupivacaína(13).

2.4.6 Aplicações Clínicas(4)

A Levobupivacaína apesar de sua recente introdução na prática clínica, tem sido utilizada em todas aquelas circunstâncias em que esta indicada um anestésico local de ação prolongada como a Bupivacaína: peridural, subdural, bloqueios do plexo braquial em diferentes níveis, bloqueio de nervos intercostais e periféricos, bloqueio peribulbar e retrobulbar, infiltração local, analgesia obstétrica, manejo da dor pós-operatória(23). A dose é similar ao da Bupivacaína com algumas variações. Os diversos trabalhos que demonstram sua menor toxicidade de Levobupivacaína comparada com a Bupivacaína racêmica tanto na relação com o sistema nervoso central como a nível cardíaco nos oferecem uma maior tranquilidade a respeito(24). Em caso de pacientes hipoproteicos, síndrome nefrótica, nos neonatos e em pacientes com disfunção hepática importante, a dose tolerável de liberação maciça é diminuída proporcionalmente.

2.4.7 Efeitos Adversos(18)

São os mesmos efeitos colaterais que podem apresentar com a Bupivacaína e eventualmente com qualquer anestésico local: hipotensão, bradicardia, náuseas, vômitos, cefaléia, constipação, tontura, sofrimento fetal.

Os sistemas de transporte a base de materiais sólidos poliméricos em forma de micropartículas apresentam maiores vantagens que os lipossomas quanto à estabilidade e reprodução. Por um lado deve evitar concentrações excessivas que provoquem maior frequência e gravidade dos efeitos colaterais e por outro lado concentrações insuficientes que podem originar a perda do efeito terapêutico.

3. MATERIAL E MÉTODO

A levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi encapsulada como base obtida pela precipitação em meio alcalino (hidróxido de amônia) proveniente de uma solução aquosa saturada de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%, conforme a literatura embasada (7, 19, 20, 25-27). A pureza da base resultante da levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi verificada por cromatografia líquida de alto desempenho por comparação com cloridrato de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%%. As microesferas foram preparadas com a base de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% dissolvida e polímero (RG 503h, Boehringer Ingelheim). A relação de peso dos polímeros da levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% utilizada foi de 60-40(peso%). A solução foi processada pelo método de spray-dried com uma Mini Büchi -191 spray-dried laboratorial usando bico de 0,7 mm (figura 1). Os parâmetros do processo foram assim definidos: temperatura de saída (43°C); aspirador (100%); bomba (2.5ml/min) e fluxo do spray (600nl/h). As microesferas foram armazenadas sob vácuo a temperatura de 4°C até caracterização.

FIGURA 1 – Mini-Buchi 191 utilizada para a caracterização das microesferas.



3.1 TAMANHO

As microesferas foram dispersas em 5 ml de uma solução aquosa Tween 20 a 0,05%, ultra centrifugadas por 10 segundos, e depois dispersas em 75 ml de água destilada. Após dispersão, a distribuição do tamanho foi avaliada por cortes a laser utilizando Malvern Mastersizer S (figura 2). Os parâmetros de distribuição do tamanho foram o volume do diâmetro $D(v; 0.5)$ para 50% da amostra, a média do volume do diâmetro, $D(4,3)$ e a amplitude; $[D(v; 0.9) - D(v; 0.1)] / D(v; 0.5)$. Cada banho foi medido por três vezes.

FIGURA 2 – Malvern Mastersizer S utilizada para observar o tamanho da microesfera.



3.2 CONTEÚDO DO MEDICAMENTO

Amostras de peso das microesferas contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (S75-R 25) cerca de 20mg foram dissolvidas em cloridrato de metileno (1ml). A droga foi então extraída em 0.1N ácido sulfúrico (5 ml) recoberto com etidocaína como controle interno. Após mexer (5min) e centrifugar (3000 RPM, 10min), 20 μ l da fase aquosa foram diluídos em 2 ml da fase móvel e 20 μ l desta solução diluída foram injetados no cromatógrafo. O sistema da cromatografia líquida de alta performance foi composto por uma bomba de água modelo 6000 equipada com um injetor automático modelo Wisp717, e com um espectro monitor LCD Milton Roy modelo 3100, detector de comprimento de onda colocado a 205 nm, e um

integrador Delsi modelo Enica21. As análises foram determinadas pelo uso de uma coluna 125 x 3 Merk Lichorpher RP-B mantida a 30°C. A fase móvel foi uma mistura a 22:78(v/v) de acetonitrile e de solução aquosa de 0.001 M KH_2PO_4 acidificada com 0.1% H_3PO_4 , a um fluxo de 0.5 ml/min.

3.3 ESTUDO DA LIBERAÇÃO *IN VITRO* (4, 28-32)

O estudo de liberação foi realizado utilizando um teste de dissolução Distek modelo 5100, e um braço rotator (100 RPM) (Figura 3). O meio de liberação foi uma solução aquosa de NaCl (900 ml), ajustada ao pH de 2.0 com HCL e termostato a 37°C. Quantidades de microesferas de peso conhecido contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% (cerca de 20 MG) foram suspensas em 1 ml de solução contendo manitol a 2.5%, carboximetilcelulose sódica a 0.75% e 0.005% de tween 20, contidas no meio de liberação. O percentual cumulativo da liberação da levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% foi mensurado continuamente a 205 nm, utilizando um espectofotômetro Uvikon Modelo Kontron 992 (figura 4). Cada banho das microesferas foi analisado triplicadamente e os dados foram processados usando o sistema de dados Icalis IDIS EE software. O tempo médio de dissolução (T_d) foi derivado dos gráficos percentuais do tempo de liberação utilizando a equação de Weibull com o pacote de software da Simed SIPHAR. O mesmo processo foi repetido para um pH de 7.35 quando da adição de tampão de fosfato (figura 4).

FIGURA 3 – Distek modelo 500 utilizado para estudo da liberação *in vitro*.

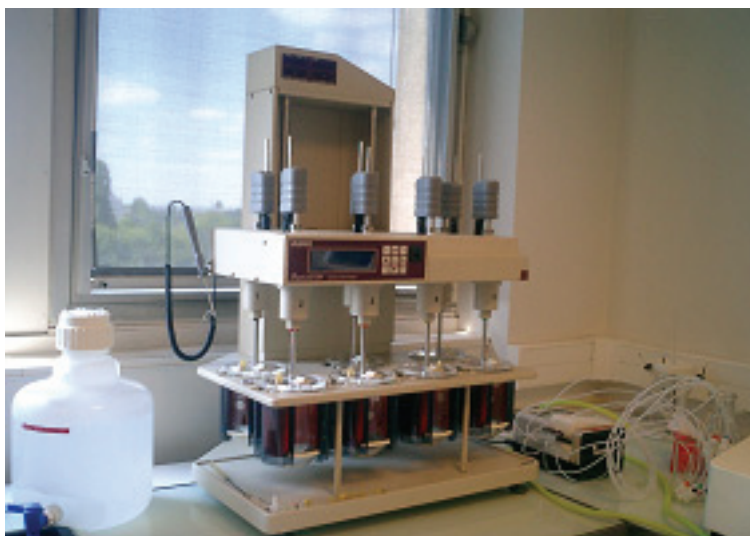


FIGURA 4 – Espectrofotômetro Uvikon Modelo Kontron 992 utilizado para a análise contínua da liberação *in vitro*.



4. RESULTADOS

O tamanho médio das microesferas contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico obtidos pelo método spray-dried foi de $10,74\mu m$ (tabela 1).

Tabela 1 – Diâmetro médio das micropartículas liofilizadas (μm).

MICROPARTÍCULAS	DIÂMETRO	QUANTIDADE
	D (v;0.1)	0.78
	D (v;0.5)	8.80
	D (v;0.9)	23.17
MÉDIA	D (4;3)	10.74

Os valores do conteúdo experimental das micropartículas naturais de levoS75-R25 e do pó liofilizado foram apresentados de acordo a tabela 2.

Tabela 2 – Dados analíticos

MICROPARTÍCULAS	Teórico	Analisado (HPLC)
Micropartículas naturais de levo S75-R25	40% (m/m)	40.1% (m/m)
Pó liofilizado de levo S75-R25	22.1% (m/m)	22.1% (m/m)

A composição de cada frasco contendo microesferas de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% para ser resuspensa em 20 mililitros de água destilada é de: Polímero RG 503H – 750mg; Levobupivacaína – 500 MG; manitol 1g; Twen 20 – 10mg. O conteúdo teórico após resuspensão será de 3.175% (m/v) de uma solução de cloridrato de levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50%.

O perfil da cinética de liberação *in vitro* das microesferas está representado na tabela 3.

Tabela 3 – Dados da liberação *in vitro*

Tempo	Quantidade liberada (%)							
	m (n=3)	± s	m (n=3)	± s	m	± s	m	± s
(h)					(n=3)		(n=3)	
	MS nat pH 2		MS lyo pH 2		MS nat pH 7.3		MS lyo pH 7.3	
0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	7,6	1,2	8,6	1,6	5,9	0,3	6,5	0,7
2	9,6	1,2	10,6	1,7	7,4	0,3	7,9	0,7
3	11,3	1,3	12,1	1,6	8,7	0,2	9,0	0,6
4	12,6	1,3	13,3	1,6	9,8	0,2	10,0	0,4
5	14,3	1,2	14,9	1,6	11,1	0,1	11,1	0,3
6,3	15,8	1,1	16,8	1,7				
6,5					13,1	0,1	13,2	0,2
7	18,1	1,3	18,2	1,9	13,5	0,1	13,6	0,2
7,5					14,0	0,1	14,0	0,3
8					14,4	0,1	14,5	0,3
8,3	20,7	1,1	20,7	1,9				
8,5					14,8	0,1	14,9	0,3
26					26,1	0,2	28,6	3,7
26,3	40,3	1,1	37,6	2,5				
50	62,9	3,4	56,9	3,5				
64					43,5	1,2	49,5	5,3
70,5	80,4	0,9	73,4	4,3				

5. DISCUSSÃO

Os anestésicos locais, tanto por sua ação periférica quanto aplicados sobre o neuroeixo, constituem importante componente no manejo multimodal da dor aguda e de algumas condições crônicas. Além de proporcionar excelente analgesia ao repouso e ao movimento, seu uso está associado a um menor consumo de opióides e a redução de seus efeitos colaterais correlacionados(33).

Os anestésicos locais são substâncias capazes de bloquear, de forma totalmente reversível, a geração e a propagação do potencial de ação em tecidos eletricamente excitáveis. Os anestésicos locais bloqueiam a condução nervosa, tanto sensorial quanto motora. Seu mecanismo de ação caracteriza-se pela propriedade de bloquear a corrente de sódio do potencial de ação nas membranas. São empregados basicamente nos procedimentos de bloqueio e infiltração para o tratamento da dor aguda e crônica.

Uma grande descoberta foi síntese da lidocaína, um AL amino-amida. A bupivacaína, uma amida de ação mais prolongada, foi sintetizada nos anos cinquenta. No final da década de 1970, iniciaram-se estudos sobre a utilização de opióides, com a finalidade de melhorar a qualidade e duração da anestesia. Na década seguinte, os estudos concentraram-se mais na preocupação com a cardiotoxicidade da bupivacaína racêmica e na busca de alternativas para sua prevenção. Já na década de 1990 e neste século, identificou-se o menor potencial cardiotoxico dos enantiômeros levógiros dos AL amídicos, culminando com a proposta do uso clínico da ropivacaína e da levobupivacaína.

A bupivacaína é o (AL) pertencente à classe das amino-aminas, mais utilizado em procedimentos cirúrgicos, principalmente para anestésias regionais

prolongadas. Os efeitos adversos (toxicidade para os sistemas nervoso central e cardiovascular) associados ao uso de bupivacaína levaram à pesquisa de novos agentes com perfil de bloqueio semelhante, mas com menor cardiotoxicidade (18). Surgiram então a ropivacaína e a levobupivacaína, sintetizados sob a forma enantiomérica S(-), demonstrando que, além de modificações moleculares, a estereosseletividade é fator importante para diminuir a cardiotoxicidade da bupivacaína.

Ropivacaína e levobupivacaína são, aproximadamente, eqüipotentes à bupivacaína racêmica para anestesia epidural e de plexos, enquanto têm 30% a 40% menos efeitos sistêmicos. Aparentemente, a menor toxicidade seja devida à reduzida afinidade pelo tecido cerebral e miocárdico com essas preparações isoméricas.

A levobupivacaína é uma droga preparada com 100% de componente levógiro. Na prática, apresenta uma grande dissociação entre bloqueio motor e sensitivo, semelhante ao que se obtém com a ropivacaína, o que representa, para algumas situações clínicas, um inconveniente. Atualmente, estudos estão sendo realizados no sentido de incrementar o bloqueio motor da levobupivacaína, para as situações clínicas indicadas, com o acréscimo de dextrobupivacaína, compondo uma mistura com excesso enantiomérico na relação de 75% de componente levógiro e 25% de componente dextrógiro.

Os anestésicos locais variam em seus efeitos clínicos e essas diferenças dependem de sua estrutura química. Reconhecem-se, na fórmula geral dos anestésicos locais, três partes fundamentais: 1. Radical aromático: é a porção lipossolúvel da droga, responsável por sua penetração no nervo. Entre os exemplos de radicais aromáticos estão o ácido benzóico (cocaína, benzocaína), o ácido para

aminobenzóico (procaína, cloro-procaína) ou a xilidina (lidocaína, bupivacaína). O ácido para-aminobenzóico, sendo uma molécula pequena, pode funcionar como hapteno e determinar reações alérgicas. 2. Cadeia intermediária: é o esqueleto da molécula do anestésico. Variações da cadeia intermediária levam a alteração tanto da potência como da toxicidade dos anestésicos locais. 3. Grupo amina: é a porção ionizável da molécula, que vai sofrer a influência do pH do meio e, portanto, é a única que pode ser manipulada pelo anestesiológico. É ela que determina a velocidade de ação do anestésico local.

De acordo com a natureza química da ligação entre o anel aromático e o grupamento amina, os anestésicos locais são divididos em dois grandes grupos: ésteres e amidas. Os ésteres são biotransformados rapidamente no plasma, pela colinesterase plasmática, enquanto que as amidas dependem de biotransformação pelos microssomos hepáticos.

As características clínicas dos anestésicos locais estão diretamente ligadas a suas propriedades físico-químicas, que por sua vez dependem de sua fórmula estrutural. Hoje se reconhece a importância da estereoisomeria na ação dos anestésicos locais (24). A maioria dos anestésicos locais de uso clínico são comercializados em sua forma racêmica, ou seja, tanto o isômero levógiro quanto o dextrógiro são utilizados. Muitas das ações indesejáveis desse grupo de drogas podem ser atribuídas a sua forma dextrógira. A ropivacaína é o primeiro anestésico local utilizado exclusivamente na forma levógira, sendo que a esse fato se atribui sua menor toxicidade.

As propriedades físico-químicas dos anestésicos locais explicam suas características clínicas, quais sejam sua velocidade de ação, potência, duração e toxicidade. A ropivacaína (34) o mais recente dos anestésicos locais, tem perfil

intermediário entre o dos agentes mais comumente utilizados em nosso meio, a lidocaína e a bupivacaína; assim sendo, espera-se que sua potência e sua toxicidade sejam também intermediárias entre as desses agentes.

Alguns anestésicos locais podem determinar um bloqueio diferencial das fibras sensitivas e motoras. O exemplo clássico é a bupivacaína. Principalmente nas concentrações de 0,125 e 0,25%, o bloqueio sensitivo efetivo pode ser conseguido com mínimo bloqueio motor. No caso da ropivacaína, espera-se que essa diferença seja ainda mais evidente. Quando comparada com a bupivacaína, a ropivacaína determina bloqueio semelhante das fibras tipo C, porém muito menor das fibras tipo A (35).

Os efeitos adversos provocados pela bupivacaína (toxicidade para o sistema nervoso central) levaram aos pesquisadores a se aprofundar no estudo das propriedades físico-químicas do anestésico local no sentido de diminuir estes efeitos. A bupivacaína apresenta o maior índice de lipossolubilidade, ou seja a lipossolubilidade facilita a penetração dos anestésicos locais nas membranas biológicas, estando relacionada com sua potência(8).

A ligação protéica tem relação com a duração da anestesia, sendo maior com a bupivacaína. A maior afinidade aos aminoácidos levógiros do canal de sódio está diretamente relacionada com o mecanismo de ação. Os anestésicos locais são bases fracas pouco solúveis e instáveis. Para torná-los mais solúveis e estáveis são apresentados comercialmente na forma de sais ácidos (cloridratos) com maior estabilidade em solução (pH de 5 a 6). O grau de dissociação influencia a distribuição e o início de ação do anestésico, já que a velocidade de bloqueio guarda uma relação inversa com o grau de ionização(36).

A grande maioria dos anestésicos locais amino-amidas empregados clinicamente são compostos quirais. Apresentam um carbono assimétrico adjacente ao grupo amina e assim existem sob a forma de isômeros que são a imagem especular um do outro. Distinguem-se os isômeros (D) destrorrotatórios e os isômeros (L) levorrotatórios. Como regra, o isômero L tem maior atividade vasoconstritora, maior duração de ação e menor toxicidade sistêmica potencial que a forma D da mesma droga. Inicialmente as formulações com um único isômero tinham um custo muito elevado de produção, por isso os anestésicos locais foram comercializados como misturas racêmicas. Atualmente, a comercialização de formulações de um só isômero é possível graças a novas técnicas de extração seletiva (37).

A presença do carbono assimétrico na bupivacaína e na ropivacaína justifica a propriedade de apresentar estereoisômeros L(-) e D(+), bem como a forma racêmica R(±). A lidocaína não apresenta quiralismo por não ter carbono assimétrico. Como os amino-ácidos do canal de sódio do nervo e do miocárdio são todos levógiros, a ligação e o desligamento do estereoisômero levógiro puro – ropivacaína – do canal do sódio ocorrem de modo mais fácil e mais rápido. Ao contrário, a forma racêmica (soma das formas L(-) 50% e D(+) 50% da bupivacaína apresenta uma ligação mais estável no canal de sódio, o que explica o efeito mais duradouro e sua maior cardiotoxicidade(38).

Destas pesquisas resultaram anestésicos como a ropivacaína e a levobupivacaína, sintetizados sob a forma enantiomérica S(-) demonstrando que, além de modificações moleculares, a estereosseletividade é fator importante para diminuir a cardiotoxicidade da bupivacaína. O evento das pesquisas sobre estereosseletividade possibilitou a modificação das proporções dos estereoisômero

R(+) e S(-) da bupivacaína e a síntese de nova formulação anestésica local, contendo 25% do isômero R (+) bupivacaína e 75% do isômero S(-) bupivacaína, melhorando o perfil anestésico da droga em relação à levobupivacaína e aumentando sua margem de segurança (38). Embora existam diferenças quanto aos perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos dos enantiômeros, propriedades físico-químicas como a solubilidade aquosa ou em lipídios e o pKa são preservadas (1) constituindo-se em fatores que podem limitar o benefício terapêutico de drogas administradas na forma tradicional. Outros fatores limitantes são ausência de uma modalidade contínua de administração, como analgesia controlada pelo paciente ou via cateter. Tentativas em prolongar o bloqueio por meio do uso de adjuvantes ou pelo aumento da concentração ou volume do anestésico local apresentam limitado benefício (5) .

Com a alteração de propriedades físicas e químicas na molécula dos anestésicos locais (síntese direcionada por estudos de correlação estrutura-função), alguns desses objetivos têm sido atingidos. Uma alternativa utilizada é o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada contendo AL em carreadores, que possibilitam a manipulação de algumas propriedades físico-químicas além de melhorarem os efeitos terapêuticos, favorecendo sua utilização clínica. Entre estes sistemas de liberação prolongada encontramos implantes (39), lipossomas (2), complexação de drogas com ciclodextrinas (11) ou micropartículas (19).

A escolha do polímero é fator importante uma vez que o mesmo deve ser biocompatível, biodegradável e com capacidade de armazenar boa quantidade do medicamento a ser utilizado(40). Os poliésteres alifáticos têm atraído interesse significativo como drogas carreadoras pelas razões acima descritas. Esta classe de polímeros degrada via hidrólise das ligações ésteres em sua estrutura (41). O

copolímero de ácido polilático-co-glicólico tem sido amplamente utilizado devido a sua taxa de degradação e propriedades mecânicas poderem ser precisamente controladas pela variação na relação ácido láctico/ ácido glicólico e pela alteração no peso molecular dos polímeros. Os polímeros de PLGA são degradados em monômeros ácidos (ex: ácido láctico e glicólico), os quais são conseqüentemente eliminados do organismo na forma de dióxido de carbono e água(42, 43). A taxa de degradação do PLGA é essencial na determinação da taxa de liberação da droga encapsulada e dependem da cristalinidade, hidrofobicidade, e peso molecular do polímero. Em geral copolímeros de PLGA ricos em ácido glicólico (até 70%) são amorfos em natureza e degradam mais rapidamente. À medida que o peso molecular do polímero diminui, a degradação se torna mais rápida em função do alto conteúdo de grupos carboxílicos ao final da cadeia do polímero o qual acelera a degradação. A matriz do PLGA é submetida a cisões randomizadas enquanto preserva a forma original e massa até que uma significativa degradação (em torno de 90%) tenha ocorrido(44).

O co-polímero de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) foi escolhido por possuir uma capacidade de cada grama poder conter até 0,8g de bupivacaína, e ser biodegradável. Diferentemente o polímero de ácido polilático (PLA) que pode conter somente 22% de anestésico local, fato que em escala industrial pode tornar sua produção inviável(16, 45-47).

A respeito do tamanho, forma e conteúdo dos polímeros, algumas considerações são necessárias. Em estudo anterior, em que formulações contendo bupivacaína e polímero nas relações percentuais de 20-80 até 60-40, as formulações que continham até 50% de cada apresentaram forma esférica, suave e sem partículas agregadas(13). No entanto a preparação contendo 60% de

anestésico local e 40% de polímero apresentou formação incompleta de microesferas, sendo que na microscopia eletrônica foram encontrados resíduos semelhantes a fibras. Estes resíduos foram considerados como drogas e não resíduos de polímeros, fato que implicaria em um grande aumento na concentração plasmática da droga injetada.

A relação ideal entre anestésico local e polímero giro entre 55% a 75%, porque uma concentração acima deste valor não está associada a um bloqueio mais prolongado e formação de resíduos(20). No presente estudo a relação entre levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% e PLGA foram de 40-60 respeitando os valores de formulação encontrados na literatura.

O tamanho médio das partículas liofilizadas em nosso trabalho foi de 10,74 micra, valor superior ao encontrado nas microesferas de bupivacaína utilizando os mesmos parâmetros (relação, AL/polímero) que foi de 7,1 micrometros. O tamanho da micropartículas e o principal determinante da liberação da droga. Daí os cuidados tomados em relação as condições de atomização das microesferas conforme descrito anteriormente. A distribuição uniforme no tamanho e outro fator importante na produção industrial de uma droga deveram lembrar que em nosso estudo 50% das partículas tiveram o tamanho de 8,80 e 90% delas o tamanho de 23,17, fato importante na administração parenteral de uma solução.

Os valores do conteúdo de anestésico local incorporado às microesferas no presente estudo (Tabela II) foram muito próximos aos valores teóricos para tal, indicando que a encapsulação ocorreu de maneira eficiente pelo método de *spray dried* em contraste com a baixa eficiência de encapsulação obtida nos processos que utilizam evaporação ou extração do solvente com alguns polímeros.

A liberação das microesferas, isto é, a cinética molecular, obedece a quantidade de anestésico local liberado das microesferas, sendo crítico para assegurar o bloqueio neural adequado, requerendo que a liberação lenta mantenha a concentração terapêutica antes da eliminação do produto. A taxa de liberação pode ser controlada por um número de fatores, entre eles a cinética de biodegradação dos polímero, propriedades físico-químicas dos polímeros) e das drogas utilizadas, termo compatibilidade entre o polímero e a droga e a forma dos polímeros.

A relação entre as quantidades de anestésico local e polímero demonstrou-se um fator importante na cinética de liberação. Em estudo de Le Corre a microesfera contendo 60% de anestésico local e 40% de polímero apresentou uma liberação de 90% de seu conteúdo em menos de 1 hora, fato que implicaria em altas concentrações plasmáticas da droga(20). Formulações contendo 50% de cada elemento apresentaram uma liberação de 50% de seu conteúdo em aproximadamente 1 hora, fato também que poderia ser prejudicial aos pacientes. O melhor perfil encontrado foi o de 40/60, fato que objetivou a escolha em nosso estudo.

O perfil cinético da liberação *in vitro* de microesferas contendo levobupivacaína em excesso enantiomérico de 50% obedeceu a um padrão bifásico, ou seja, um aumento inicial seguido de uma fase de liberação lenta. Este aumento inicial é característico dos polímeros de PLGA durante a primeira hora de incubação seguida depois de liberação controlada mais lenta. O peso molecular do polímero pode afetar sua taxa de degradação e liberação da droga. Um aumento do peso molecular diminui a difusibilidade e, portanto a taxa de liberação da droga. O maior mecanismo de liberação para muitas drogas é a difusão através de poros

preenchidos por água, formados na medida em que há degradação do polímero em monômeros e oligômeros que se difundem para fora da matriz polimérica. Estes produtos são formados mais facilmente na degradação de polímeros de menor peso molecular.

Este perfil foi analisado em dois diferentes pHs, um ácido o qual facilitaria a liberação do conteúdo das micropartículas e outro mimetizando o pH humano por meio da adição de um tampão de fosfato à solução. Comparativamente às microesferas de bupivacaína preparadas de maneira semelhante ao estudo atual, o aumento inicial não foi significativo, fato que pode ser justificado pelo número pequeno de amostras (3) analisadas neste processo, ou pela própria característica apresentada por esta nova formulação de microesfera com o anestésico local. Na realidade 50% do conteúdo das microesferas de levobupivacaína em excesso enantiomérico foi liberado em um tempo médio de 64 horas, fato diferente do encontrado com a microesfera de bupivacaína que foi de 8,5 horas. Não obstante a isto os resultados da avaliação *in vitro* deste estudo vão de encontro ao apresentado em estudo anterior que prevê a liberação de 20% do conteúdo total de bupivacaína nas primeiras 24 horas, seguida da liberação de 7% de seu conteúdo por dia até o décimo dia. As microesferas são degradadas em monômeros que são metabolizados via ciclo de Krebs.

Claramente o tamanho da microesfera pode afetar a taxa de liberação de uma droga. À medida que há redução do tamanho, a superfície de área em relação ao volume da partícula aumenta. Então, para uma determinada taxa de difusão através da microesfera, a taxa de fluxo da droga para fora da matriz da microesfera, por massa de formulação, aumentará com a diminuição do tamanho da partícula. A

penetração de água em partículas menores pode ser mais rápida em razão da menor distância a ser percorrida da superfície ao centro da partícula.

Para a preparação de microesferas utilizando polímeros biodegradáveis, é importante a escolha de apropriada encapsulação, processo que atenda alguns requisitos (22, 40, 44, 48).

Em primeiro lugar, a estabilidade química e atividade biológica da droga incorporada deve ser mantida durante o processo de encapsulação. Segundo, a eficiência da encapsulação e as microesferas produzidas devem ter alto grau de encapsulação. Terceiro, as microesferas produzidas devem possuir tamanho razoável, não superior a 250 micrometros para que possam ser administrados utilizando seringa e agulha por via parenteral. Quarto, a taxa de liberação da droga deve obedecer a um padrão sem uma significativa taxa de liberação inicial. Quinto, o processo empregado deve produzir microesferas livres, fazendo com que a preparação de uma suspensão uniforme seja facilmente obtida.

Comparando com outros métodos convencionais, o spray-dried oferece várias vantagens. Demonstrou uma boa reprodutibilidade, envolvendo condições relativamente moderadas, permitindo o controle do tamanho das partículas e menor dependência da solubilidade entre droga e polímero. A droga é dissolvida ou dispersa na solução contendo o polímero, na qual solventes voláteis são preferidos (49-52). A solução ou suspensão resultante é submetida ao processo de spray-dried para produzir as microesferas. O tamanho das micropartículas é determinado dependendo das condições de atomização. A maior desvantagem desta técnica é a perda significativa de quantidades do produto, primariamente em função da adesão das micropartículas na parede interna do aparelho. Além de que aglomerados de microesferas são freqüentemente obtidos uma vez que estas são muito adesivas

antes da remoção completa do solvente. As condições de atomização foram determinadas em trabalho anterior onde foram utilizadas microesferas de bupivacaína em 6 diferentes polímeros de pesos moleculares e relação ácido láctico e glicólico. Foram também utilizadas matérias de diferentes laboratórios. O diâmetro das microesferas diminui à medida que se aumenta a velocidade da bomba de spray-dried e permanece constante acima de 10%. Então os autores escolheram o valor superior acima de 15%, que corresponde a uma velocidade entre 2,0-2,5 ml/min. Estes parâmetros foram utilizados para comparar a forma e tamanho das microesferas. A concentração máxima de polímero que proporcionou partículas esféricas e individualizadas foi 4% para os polímeros RG503H a RG503, 3% para o polímero RG755 e 2% para os polímeros fornecidos pelo laboratório Alkermes. Estes dados determinaram a escolha do polímero RG503H fornecido pelo laboratório Boehringer Ingelheim, bem como os parâmetros definidos para o processo de spray-dried.

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a preparação de microesferas contendo anestésico local por meio da emulsificação da levobupicaína em excesso enantiomérico de 50% com o polímero (PLGA), com a eliminação do solvente por meio do método *spray-drye* e liofilização do mesmo, é factível, com resultados semelhantes aos encontrados com a bupivacaína.

REFERÊNCIAS

1. Whiteside JB, Wildsmith JA. Developments in local anaesthetic drugs. *Br J Anaesth*. 2001 Jul;87(1):27-35.
2. Araújo D, Pinto L, Braga A. Formulações de anestésicos locais de liberação prolongada: Aplicações terapêuticas. *Rev Bras Anesthesiol*. 2003;53:663-71.
3. Varde NK, Pack DW. Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert Opin Biol Ther*. 2004 Jan;4(1):35-51.
4. Park J, Ye M, Park K. Biodegradable Polymers for Microencapsulation of Drugs. *Molecules*. 2005;10(1):146-61.
5. Neal JM, Hebl JR, Gerancher JC, Hogan QH. Brachial plexus anesthesia: essentials of our current understanding. *Reg Anesth Pain Med*. 2002 Jul-Aug;27(4):402-28.
6. Barash P, Cullen B, Stoelting R. *Tratado de Anestesiologia Clínica*. São Paulo: Manole; 1993.
7. Estebe JP, Le Corre P, Du Plessis L, Chevanne F, Cathelineau G, Le Verge R, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of bupivacaine-loaded microspheres on a brachial plexus block model in sheep. *Anesth Analg*. 2001 Aug;93(2):447-55, 4th contents page.
8. Covino BG. Pharmacology of local anaesthetic agents. *Br J Anaesth*. 1986 Jul;58(7):701-16.
9. Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine*. 2006 Mar;2(1):8-21.
10. Gesztes A, Mezei M. Topical anesthesia of the skin by liposome-encapsulated tetracaine. *Anesth Analg*. 1988 Nov;67(11):1079-81.
11. Araújo D, Fraceto L, Afa B. Sistemas de liberação controlada com bupivacaína racêmica (S50-R50) e mistura enantiomérica de bupivacaína (S75-R25 BRA): Efeitos da complexação com ciclodextrinas no bloqueio do nervo ciático em camundongos. *Rev Bras Anesthesiol*. 2005;55:316-28.
12. Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro and in vivo of polylactic acid microspheres containing dibucaine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1982 Oct;30(10):3719-27.
13. Chen PC, Park YJ, Chang LC, Kohane DS, Bartlett RH, Langer R, et al. Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. I. In vitro characterization. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Sep 1;70(3):412-9.
14. Sznitowska M, Placzek M. Use of 1,4-dioxan for preparation of bupivacaine loaded PLGA microspheres with an o/w emulsion extraction process. *Pharmazie*. 2003 Jun;58(6):437-8.
15. Choi HS, Seo SA, Khang G, Rhee JM, Lee HB. Preparation and characterization of fentanyl-loaded PLGA microspheres: in vitro release profiles. *Int J Pharm*. 2002 Mar 2;234(1-2):195-203.
16. Seo SA, Khang G, Rhee JM, Kim J, Lee HB. Study on in vitro release patterns of fentanyl-loaded PLGA microspheres. *J Microencapsul*. 2003 Sep-Oct;20(5):569-79.

17. Fu X, Ping Q, Gao Y. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J Microencapsul.* 2005 Feb;22(1):57-66.
18. Mather LE, Chang DH. Cardiotoxicity with modern local anaesthetics: is there a safer choice? *Drugs.* 2001;61(3):333-42.
19. Le Corre P, Estebe JP, Chevanne F, Malledant Y, Le Verge R. Spinal controlled delivery of bupivacaine from DL-lactic acid oligomer microspheres. *J Pharm Sci.* 1995 Jan;84(1):75-8.
20. Le Corre P, Rytting JH, Gajan V, Chevanne F, Le Verge R. In vitro controlled release kinetics of local anaesthetics from poly(D,L-lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres. *J Microencapsul.* 1997 Mar-Apr;14(2):243-55.
21. Li LC, Zhu L, Song JF, Deng JS, Bandopadhyay R, Wurster DE. Effect of solid state transition on the physical stability of suspensions containing bupivacaine lipid microparticles. *Pharm Dev Technol.* 2005;10(2):309-18.
22. Kohane DS, Smith SE, Louis DN, Colombo G, Ghoroghchian P, Hunfeld NG, et al. Prolonged duration local anesthesia from tetrodotoxin-enhanced local anesthetic microspheres. *Pain.* 2003 Jul;104(1-2):415-21.
23. Montanari L, Cilurzo F, Selmin F, Conti B, Genta I, Poletti G, et al. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing bupivacaine: comparison between gamma and beta irradiation effects. *J Control Release.* 2003 Jul 31;90(3):281-90.
24. Akerman B, Hellberg IB, Trossvik C. Primary evaluation of the local anaesthetic properties of the amino amide agent ropivacaine (LEA 103). *Acta Anaesthesiol Scand.* 1988 Oct;32(7):571-8.
25. Estebe JP, Le Corre P, Clement R, Du Plessis L, Chevanne F, Le Verge R, et al. Effect of dexamethasone on motor brachial plexus block with bupivacaine and with bupivacaine-loaded microspheres in a sheep model. *Eur J Anaesthesiol.* 2003 Apr;20(4):305-10.
26. Le Corre P, Estebe JP, Clement R, Du Plessis L, Chevanne F, Ecoffey C, et al. Spray-dried bupivacaine-loaded microspheres: in vitro evaluation and biopharmaceutics of bupivacaine following brachial plexus administration in sheep. *Int J Pharm.* 2002 May 15;238(1-2):191-203.
27. Estebe JP, Le Corre P, Malledant Y, Chevanne F, Le Verge R. Prolongation of spinal anesthesia with bupivacaine-loaded (DL-lactide) microspheres. *Anesth Analg.* 1995 Jul;81(1):99-103.
28. Heya T, Okada H, Ogawa Y, Toguchi H. In vitro and in vivo evaluation of thyrotrophin releasing hormone release from copoly(dl-lactic/glycolic acid) microspheres. *J Pharm Sci.* 1994 May;83(5):636-40.
29. Conti S, Gaisford S, Buckton G, Maggi L, Conte U. The role of solution calorimetry in investigating controlled-release processes from polymeric drug delivery systems. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007 Jun 12.
30. Andreopoulos AG. Classification and characteristics of polymeric controlled-release systems. *Med Device Technol.* 2003 Sep;14(7):20-1.
31. Braybrook JH, Hall LD. Polymeric controlled release systems. *Drug Des Deliv.* 1990 Jun;6(2):73-86.
32. Laurencin CT, Langer R. Polymeric controlled release systems: new methods for drug delivery. *Clin Lab Med.* 1987 Jun;7(2):301-23.
33. Borgeat A, Ekatodramis G, Schenker CA. Postoperative nausea and vomiting in regional anesthesia: a review. *Anesthesiology.* 2003 Feb;98(2):530-47.

34. Rosenberg PH, Kytta J, Alila A. Absorption of bupivacaine, etidocaine, lignocaine and ropivacaine into n-heptane, rat sciatic nerve, and human extradural and subcutaneous fat. *Br J Anaesth*. 1986 Mar;58(3):310-4.
35. Bader AM, Datta S, Flanagan H, Covino BG. Comparison of bupivacaine- and ropivacaine-induced conduction blockade in the isolated rabbit vagus nerve. *Anesth Analg*. 1989 Jun;68(6):724-7.
36. Vale NB, Leite JR. Decreased susceptibility to local anesthetics-induced convulsions after paradoxical sleep deprivation. *Psychopharmacology (Berl)*. 1988;94(1):138-40.
37. Santos AC, Arthur GR, Lehning EJ, Finster M. Comparative pharmacokinetics of ropivacaine and bupivacaine in nonpregnant and pregnant ewes. *Anesth Analg*. 1997 Jul;85(1):87-93.
38. Simonetti M. Avaliação da atividade anestésica local da S(-) bupivacaína: estudo experimental, in vivo em nervo ciático de rato. *Rev Bras Anesthesiol*. 1997;47:425-34.
39. Blanco MD, Bernardo MV, Gomez C, Muniz E, Teijon JM. Bupivacaine-loaded comatrix formed by albumin microspheres included in a poly(lactide-co-glycolide) film: in vivo biocompatibility and drug release studies. *Biomaterials*. 1999 Oct;20(20):1919-24.
40. Yang YY, Chung TS, Ng NP. Morphology, drug distribution, and in vitro release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method. *Biomaterials*. 2001 Feb;22(3):231-41.
41. Cirpanli Y, Unlu N, Calis S, Hincal AA. Formulation and in-vitro characterization of retinoic acid loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J Microencapsul*. 2005 Dec;22(8):877-89.
42. Ito Y, Hasuda H, Morimatsu M, Takagi N, Hirai Y. A microfabrication method of a biodegradable polymer chip for a controlled release system. *J Biomater Sci Polym Ed*. 2005;16(8):949-55.
43. Wakiyama N, Juni K, Nakano M. Preparation and evaluation in vitro of polylactic acid microspheres containing local anesthetics. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1981 Nov;29(11):3363-8.
44. Jackson JK, Hung T, Letchford K, Burt HM. The characterization of paclitaxel-loaded microspheres manufactured from blends of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and low molecular weight diblock copolymers. *Int J Pharm*. 2007 Sep 5;342(1-2):6-17.
45. Tang H, Xu N, Meng J, Wang C, Nie SF, Pan WS. Application of a Novel Approach to Prepare Biodegradable Polylactic-co-glycolic Acid Microspheres: Surface Liquid Spraying. *Yakugaku Zasshi*. 2007 Nov;127(11):1851-62.
46. Xu FH, Zhang Q. Recent advances in the preparation progress of protein/peptide drug loaded PLA/PLGA microspheres. *Yao Xue Xue Bao*. 2007 Jan;42(1):1-7.
47. Reich G. Ultrasound-induced degradation of PLA and PLGA during microsphere processing: influence of formulation variables. *Eur J Pharm Biopharm*. 1998 Mar;45(2):165-71.
48. Witschi C, Doelker E. Influence of the microencapsulation method and peptide loading on poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) degradation during in vitro testing. *J Control Release*. 1998 Feb 12;51(2-3):327-41.

49. Kempen DH, Lu L, Zhu X, Kim C, Jabbari E, Dhert WJ, et al. Development of biodegradable poly(propylene fumarate)/poly(lactic-co-glycolic acid) blend microspheres. II. Controlled drug release and microsphere degradation. *J Biomed Mater Res A*. 2004 Aug 1;70(2):293-302.
50. Langer R. Implantable controlled release systems. *Pharmacol Ther*. 1983;21(1):35-51.
51. Thoma K, Schlutermann B. [Relationships between manufacturing parameters and pharmaceutical-technological requirements of biodegradable microparticles. 2. Preparation of injectable microparticles in biodegradable polyester]. *Pharmazie*. 1992 Feb;47(2):115-9.
52. Zhu KJ, Jiang HL, Du XY, Wang J, Xu WX, Liu SF. Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique. *J Microencapsul*. 2001 Mar-Apr;18(2):247-60.